

### **REMARKS**

Claims 17, 19, 20 and 23 have been canceled; claims 15-16, 18 and 21 have been amended. New claims 25-38 have been added. Upon entry of this amendment, claims 15-16, 18, 21 and 25-38 will be pending. No new matter has been added.

Support for claims 15 and 30-38 can be found, for example, at page 3, lines 19-30; page 5, lines 15-30; page 6, lines 1-7; starting at page 9, line 21 through page 11; starting at page 13, line 25 through page 14, line 25; page 23, lines 11-22; page 24, lines 1-8, of the specification. Support for claim 25 can be found, e.g., at page 5, lines 25-29 of the specification.

Support for claims 26-27 can be found, e.g., at page 6, lines 5-15; page 12, lines 17-20, and page 22, lines 18-23 of the specification. Support for claim 28 can be found, e.g., at page 7, lines 27 through page 8, lines 1-2; page 13, lines 13-24; and page 23, lines 6-10 of the specification.

The claim amendments and cancellations made herein have been made solely to expedite prosecution of the instant application and should not be construed as an acquiescence to any of the Examiner's rejections.

### **Formalities**

The specification has been amended to update the status of U.S.S.N. 09/978,758, now U.S. Patent No. 6,706,507, as requested by the Examiner.

### **Claim Rejections under 35 U.S.C. §112, Second Paragraph**

On pages 3-5 of the outstanding Office Action, the Office has rejected the claims under 35 U.S.C. §112, second paragraph, as being indefinite for failing to particularly point out and distinctly claim the subject matter which applicant regards as the invention. Each ground for this rejection is addressed individually below.

a. Claims 15 and 23 (and claims 16-21 depending therefrom) are rejected because of their recitation of the phrase "processed product of the microorganism." According to the

Examiner, this phrase encompasses a wide variety of "processed products." This rejection has been met by amending claim 15 to delete the phrase objected to by the Examiner. Claims 17, 19-20 and 23 have been canceled. None of the amended or newly added claims recites the phrase "processed product of the microorganism," thereby rendering this rejection moot.

b. Claims 15 and 23 (and claims 16-21 depending therefrom) are rejected because of the phrase "preferentially oxidizes (R)-2-octanol." This rejection has been met by amending claim 15 to delete the phrase objected to by the Examiner. Claims 17, 19-20 and 23 have been canceled, thereby obviating the rejection. None of the amended or newly added claims recites the phrase "preferentially oxidizes (R)-2-octanol."

Although this rejection has been obviated by the claim amendments and cancellations made herein, Applicants wish to clarify for the record that the present specification clearly says that the term "preferentially oxidizes (R)-2-octanol" means that "the enzymatic activity of (R)-2-octanol dehydrogenase on S form is 50 or less, preferably 20 or less, and more preferably 10 or less when taking the activity on R form as 100" (see e.g., page 12, lines 13-16 of the specification).

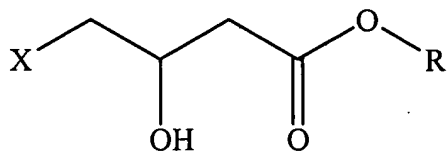
c. Claims 15 and 18 (and claims 16-21 depending therefrom) are rejected because they recite the term "alcohol." These claims have been canceled or amended to delete the term objected to by the Examiner, thus rendering this rejection moot. None of the amended or newly added claims recites the term "alcohol" broadly. The claims, as presently amended or added, specify the specific types of alcohol encompassed by the claims, e.g., an (S)-4-halo-3-hydroxybutyric acid ester derivative.

d. Claims 15 and 18 (and claims 16-21 depending therefrom) are rejected by their recitation of the term "a microorganism." According to the Examiner, "[i]t is not clear to the Examiner what types of microorganism are encompassed in the claims".

This rejection is respectfully traversed. The term "microorganism" may be broad,

but it is not indefinite. One of ordinary skill in the art would readily understand what it means: Any microorganism (recombinant or not) capable of producing the enzyme described in the claims. The specification describes in detail many kinds of microorganisms that can be used for the present invention (see e.g., page 18, line 17 to page 22, line 26 of the specification). Accordingly, this term is not indefinite. Newly added claims 26-27 specify that the microorganisms encompassed by these claims belong to the genus *Pichia*, the genus *Candida*, or the genus *Ogataea*.

e. Claim 18 is rejected because it recites the phrase "alcohol is (S)-4-chloro-3-hydroxybutyric acid ethyl ester". According to the Examiner, "[i]t is not clear how an alcohol can be an ester. To expedite prosecution, this rejection has been met by deleting the term "alcohol" from claim 18. However, Applicants wish to clarify to the Examiner that an (S)-4-chloro-3-hydroxybutyric acid ethyl ester is indeed a secondary alcohol having the following chemical representation:



wherein R is an ethyl group, and X is a chloride atom.

In view of the claim amendments and/or arguments set forth above, Applicants respectfully request that the rejection of the claims under 35 U.S.C. §112, second paragraph, be withdrawn.

Rejection of Claims 15-21 and 23 under 35 U.S.C. §112, First Paragraph

The Office has rejected claims 15-21 and 23 under 35 U.S.C. 112, first paragraph, "as containing subject matter which was not described in the specification in such a way as to reasonably convey to one skilled in the relevant art that the inventor(s), at the time the application was filed, had possession of the claimed invention." The Examiner alleges that:

[T]he specification fails to describe the structure of the genus comprising variants and mutants of any (R)-2-octanol dehydrogenase, genus comprising any substrates and a genus comprising any microorganism producing (R)-2-octanol dehydrogenase used in a method for producing any alcohol.

This rejection has been met by amending the claims to more particularly define the structural and/or physicochemical features of the (R)-2-octanol dehydrogenase, the ketone substrates and corresponding alcohols used in the claimed methods. As amended, claim 15 and claims dependent therefrom are directed to a method of producing an (S)-4-halo-3-hydroxybutyric acid ester derivative by reacting an (R)-2-octanol dehydrogenase having the structural and/or physicochemical properties specified (e.g., a dehydrogenase having a molecular weight specified and having a polypeptide sequence that is either encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or that includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or homologous variants thereof). Similarly, the newly added claims particularly define the features of the (R)-2-octanol dehydrogenase, the alcohol product, and reaction conditions used in the claimed methods. Reconsideration and withdrawal of this rejection is respectfully requested.

Rejection of Claims 15-21 and 23 under 35 U.S.C. §112, First Paragraph

The Office has further rejected claims 15-21 and 23 under 35 U.S.C. 112, first paragraph, because:

[T]he specification, while being enabling for a method for the producing a (S)4-chloro-3-hydroxybutyric acid ethyl ester or a propoxybenzene using a (R)-2-octanol dehydrogenase of SEQ ID NO:2 or a transformant producing said enzyme, does not reasonably provide enablement for a method for the production of any or all alcohol using mutants and variants of any or all (R)-2-octanol dehydrogenase, or any microorganism producing mutants and variants of any or all (R)-2-otanol dehydrogenase or using any treated products of any microorganism producing (R)-2-octanol dehydrogenase.

More specifically, the Examiner states that:

Thus, applicants have not provided sufficient guidance to enable one of ordinary skill in the art to make and use the claimed invention in a manner reasonably correlated with the scope of the claims broadly including a method for the production of any alcohol using any substrates and variants and mutants of any (R)-2-octanol dehydrogenase, a microorganism producing variants and mutants of any (R)-2-octanol dehydrogenase and a product of a microorganism producing (R)-2-octanol dehydrogenase.

To expedite prosecution, claims 15-16, 18 and 21 have been amended to more particularly define the structural and/or physicochemical features of the (R)-2-octanol dehydrogenase, as well as the ketone substrates and alcohol products used in the claimed methods. Claims 17, 19, 20 and 23 have been canceled. Thus, none of the pending claims, as presently amended or newly added, broadly encompasses methods for the production of any alcohol using any substrates and variants and mutants of any (R)-2-octanol dehydrogenase, a microorganism producing variants and mutants of any (R)-2-octanol dehydrogenase and a product of a microorganism producing (R)-2-octanol dehydrogenase.

Reconsideration and withdrawal of this rejection is respectfully requested.

Rejection of Claims 15-21 and 23 under 35 U.S.C. §102(b)

The Office has rejected claims 15, 17-19, 21 and 23 under 35 U.S.C. §102(b) as being anticipated by Kise *et al.* (JP 01-277494 - reference form PTO-892). According to the Examiner this reference allegedly “discloses a method for producing an optically active alcohol by reacting

an NADH dependent (R)-2-octanol dehydrogenase with 4-chloroacetoacetic acid ethyl ester (abstract - English Translation of JP 01-277494 - form PTO-892)".

Applicants respectfully traverse this rejection. The claims, as presently pending, are directed to methods for producing an (S)-4-halo-3-hydroxybutyric acid ester derivative using an (R)-2-octanol dehydrogenase having a molecular weight of about 30,000 Da and 83,000 Da, as determined by SDS-PAGE and gel filtration, respectively, and having a polypeptide sequence that is encoded by a specific nucleotide sequence, or having the amino acid sequence specified, or sequences homologous thereto.

The cited reference discloses the production of optically active alcohols using a partially purified 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase obtained from *Cellulomonas turubata* KE31 strain (FERM P-9059) (see Derwent abstract). There is no disclosure in the cited reference of any amino acid or nucleotide sequence corresponding to the 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, so one must instead focus on other properties. Although the physicochemical properties of the Kise *et al.* enzyme are not fully disclosed in the specification of JP 01-277494, an earlier filed Japanese Patent Application by Kise *et al.*, published as Japanese Patent Application Kokai Publication No. S63-233785, discloses some of its enzymatic properties. A copy of Japanese Patent Application Kokai Publication No. S63-233785 and certified copy of a partial English translation of the claims of the publication are submitted herewith as Appendix A. As provided in the English translation of Kokai Publication No. S63-233785, the molecular weight of Kise *et al.*'s 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase is about 24,000 when determined by SDS-PAGE. In contrast, the (R)-2-octanol dehydrogenase enzyme encompassed by the present claims has a molecular weight of about 30,000 when determined by SDS-PAGE. This indicates that the dehydrogenase disclosed by Kise *et al.* has a different molecular weight and electrophoretic mobility than the one used in the claimed methods.

Moreover, as shown in the examples of the English translation of JP 01-277494, certified English translation is submitted herewith as Appendix B, the reduction reactions using the 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase shown by Kise *et al.* were performed at pH 7.0, suggesting that

the pH optimum of the Kise *et al.* enzyme is not within the PH 5.0 to 6.5 range of the SEQ ID NO:2 enzyme.

Because the properties of the enzyme disclosed in Kise *et al.* differ from those of the enzyme specified by the claimed methods, the enzyme disclosed by Kise *et al.* is a different enzyme (and, therefore, has a different amino acid and nucleotide sequence) from the one used in the claimed methods. Since the claims, as currently pending, structurally define the (R)-2-octanol dehydrogenase in a way that distinguishes it from the one disclosed by Kise *et al.*, this reference does not anticipate these claims.

#### Rejection of Claim 16 under 35 U.S.C. §102(e)

Claim 16 is rejected under 35 U.S.C. §102(e) as allegedly being anticipated by Bommanus *et al.* U.S. Patent Application Pub. No. 2003/0054520 - form PTO-892). According to the Examiner, Bommanus *et al.* disclose a method for producing an alcohol with a (R)-alcohol dehydrogenase that uses NADH. The apparent basis for the rejection of claim 16 is that, according to the Examiner, claim 16 has an effective filing date of December 8, 2000 based on JP 2000-374593. Therefore, according to the Examiner, U.S. 2003/0054520 qualifies as art under §102(e) against claim 16.

Applicants respectfully traverse this rejection. Bommanus *et al.* is not citable against any of the present claims. Bommanus *et al.* is §102(e) prior art as of its earliest effective U.S. filing date, i.e., July 23, 2001. This does not predate even the later of the two Japanese priority dates of the present application. (As the Examiner is no doubt aware, the German priority date of a U.S. application is not the §102(e) date of the application.) As acknowledged by the Examiner, support for claim 16 was provided at least as early as December 8, 2000 based on the filing date of JP 2000-374593. Since Applicants' priority date pre-dates the effective U.S. filing date of U.S. 2003/0054520, this reference is not prior art under 102(e) against the instant application.

Furthermore, claim 16, as amended, is directed to a method for producing an alcohol by a host cell transformed with a vector comprising a polynucleotide encoding a (R)-2-octanol dehydrogenase having the sequence specified. The enzyme disclosed by Bommanus *et al.* shows

only about 39% identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. An alignment of these sequences is submitted herewith as Appendix C. Therefore, even if this reference would qualify as art under §102(e), it would not anticipate claim 16, as currently amended.

In view of the foregoing, reconsideration and withdrawal of this rejection is respectfully requested.

Rejection of Claim 20 under 35 U.S.C. §103(a)

On pages 13-14 of the Office Action, the Office has rejected claim 20 under 35 U.S.C. §103(a) as being unpatentable over Kise *et al.* (JP 01-277494) in view of ChemExper.

Claim 20 has been canceled, thus obviating the Examiner's rejection.

Reconsideration and withdrawal of this rejection is respectfully requested.



Applicant : Masatake Kudoh et al.  
Serial No. : 10/766,421  
Filed : January 27, 2004  
Page : 15 of 15

Attorney's Docket No.: 14879-090002 / D1-A0001YIP-  
USD1

Enclosed is a \$450.00 check for the Petition for Extension of Time fee. Please apply any other charges or credits to deposit account 06-1050.

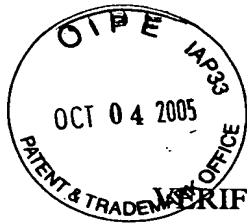
Respectfully submitted,

Date: October 4, 2005



Diana Collazo  
Reg. No. 46,635

Fish & Richardson P.C.  
225 Franklin Street  
Boston, MA 02110  
Telephone: (617) 542-5070  
Facsimile: (617) 542-8906



VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Shoko Takizawa

of 6th Fl., Kantetsu Tsukuba-Science-City Bldg. 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura, Ibaraki, JAPAN

declare as follows:

1. That I am well acquainted with both the English and Japanese languages, and
2. That the attached document is a true and correct partial translation of Japanese Kokai Publication No. S63-233785 (the translated portion is marked A), which was made by me to the best of my knowledge and belief.

September 5, 2005

(Date)

Shoko Takizawa

(Signature of Translator)

**Partial Translation of Japanese Patent Application**  
**Kokai Publication No. S63-233785**

2. Claims

- (1) A stable 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase having the following properties:
  - (a) The enzyme is capable of reducing a steroid compound or carbonyl group-containing compound, which has an oxo group at position 3;
  - (b) The enzyme has a molecular weight of 98,000 when determined by native polyacrylamide electrophoresis and of 24,000 when determined by SDS electrophoresis;
  - (c) The enzyme is stable when placed at pH 6-8 (1/15M phosphate buffer) and at 30°C for 24 hours and when placed at pH 7 and at 60°C for 2 hours;
  
- (2) A method of producing a 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, the method comprising culturing a microorganism that belongs to the genus *Cellulomonas* and is capable of producing a 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase having the following properties:
  - (a) The enzyme is capable of reducing a steroid compound or carbonyl group-containing compound, which has an oxo group at position 3;
  - (b) The enzyme has a molecular weight of 98,000 when determined by native polyacrylamide electrophoresis and of 24,000 when determined by SDS electrophoresis;
  - (c) The enzyme is stable when placed at pH 6-8 (1/15M phosphate buffer) and at 30°C for 24 hours and when placed at pH 7 and at 60°C for 2 hours;and recovering the 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from the culture.

⑮ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑬ 公開特許公報(A)

昭63-233785

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 9/04  
C 12 P 41/00  
(C 12 N 9/04  
C 12 R 1:01)

識別記号

庁内整理番号

Z-7823-4B  
Z-7823-4B

④ 公開 昭和63年(1988)9月29日

審査請求 有 発明の数 2 (全7頁)

⑫ 発明の名称 新規な3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素とその製造方法

⑩ 特 願 昭62-69598

⑨ 出 願 昭62(1987)3月24日

⑦ 発 明 者 木 瀬 昇 一 広島県大竹市御園1丁目2番5号

⑧ 発 明 者 前 田 英 勝 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

⑦ 発 明 者 林 田 幹 夫 広島県大竹市御園1丁目2番5号

⑩ 出 願 人 工業技術院長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

⑥ 指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究所長

#### 明 細 書

#### 1. 発明の名称

新規な3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素とその製造方法

#### 2. 特許請求の範囲

(1) 下記の特徴を有し、安定性の高い3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素

(a) 3位にオキソ基を有するステロイド化合物やカルボニル基含有化合物に対して還元能を有する。

(b) ネイティブ・ポリアクリルアミド電気泳動法で測定した分子量が92,000であり、SDS電気泳動法で測定した分子量が24,000である。

(c) pH 6~8 (1/15M リン酸緩衝液中) で30℃、24hr放置した場合およびpH 7で60℃、2hr放置した場合何れも安定である。

(2) セルロセナス属に属し、下記の特徴を有する3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素生産能を有する微生物を培養し、該培養物から3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を採取することを特

徴とする3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の製造方法。

(a) 3位にオキソ基を有するステロイド化合物やカルボニル基含有化合物に対して還元能を有する。

(b) ネイティブ・ポリアクリルアミド電気泳動法で測定した分子量が92,000であり、SDS電気泳動法で測定した分子量が24,000である。

(c) pH 6~8 (1/15M リン酸緩衝液中) で30℃、24hr放置した場合およびpH 7で60℃、2hr放置した場合何れも安定である。

#### 3. 発明の詳細な説明

##### 〔産業上の利用分野〕

近年、酵素を産業上に利用する種々の試みが展開されている。1つは酵素の基質特異性を利用して種多な化合物が混入している組成の中から特定の化合物の濃度を選択的に測定する臨床診断用酵素として、また1つは従来のエネルギー多消費型の化学反応工程に酵素を用いて省エネルギープロセスを確立するためのバイオリアクターへの利用

である。本発明中の酵素は、ステロイド化合物の中ではアンドロステロン、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸およびコール酸などの $3\alpha$ -ヒドロキシステロイド化合物に特異的に作用することから、血液中の胆汁酸を測定する臨床診断用酵素としての利用が期待される。また当該酵素は $3\alpha$ -ヒドロキシステロイド化合物以外に、種々のカルボニル基を持つ化合物、例えばシタロヘキサノンやメチルイソブチルケトンに作用し、対応するアルコールに還元したり、さらに $\alpha$ -メチルケトンに不斉還元して香料として有用な $\alpha$ -メントールに還元できるので、バイオリアクターによる有用物質生産に利用できる。

#### [従来の技術]

本発明中の酵素に類似の機能を持つ酵素として *Yeast extract from ATCC 11996* の生産する $3\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素（以下 $3\alpha$ -HSDHと略す）が知られている（例えば「P.J. Bercha, P. Teller, J. Biol. Chem., 190巻, 651-674頁, 1951年」）。 $3\alpha$ -HSDHはアンドロステロン、

コール酸ナトリウム、コール酸やデオキシコール酸などの、いわゆる $3\alpha$ -ヒドロキシステロイド化合物に対して大きな活性を持っている。

#### [発明が解決しようとする課題]

酵素を工業上に使用する場合、安定性の高いことが要求される。従来の $3\alpha$ -HSDHは40℃、10分間の加熱によって全く活性を失う。この様に熱安定性が低いという課題点が解決されれば、すなわちもっと安定性の高い酵素が開発できれば、その実用価値がさらに高まることが期待される。本発明は、このような安定性の高い新規な $3\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素とその製造法を提供するものである。

#### [課題を解決するための手段]

従来の $3\alpha$ -HSDHよりも安定性が高い酵素を取得する目的で、土壌等から微生物のスクリーニングを行った。その結果、セルロモナス属に属すると認められる一菌株がその目的にかなった性質を有していることを見いだしたものである。すなわちセルロモナス属に属し、新規な $3\alpha$ -HSDH

生産能を有する微生物を培養し、培養物から新規な $3\alpha$ -HSDHを採取することを特徴とする新規な $3\alpha$ -HSDHの製造法に関するものである。

本発明に係わる新規な $3\alpha$ -HSDHの製造は当該酵素生産菌を培地に培養することによって行われる。当該酵素生産菌としては、一例として本発明者が土壌中より分離したセルロモナス・ツルバタに属する株が挙げられる。なお本菌の菌学的性質は第1表および第2表に示すとおりである。

第1表 セルロモナス・ツルバタ・K231の菌学的性質

#### 形態的性質

肉汁琼脂培地上(30℃)

5hr 長桿(1~2 $\mu$ m)  
48hr 短桿(0.5~1 $\mu$ m)

運動性 +

孢子形成 -

グラム染色 +

培養的性質

肉汁琼脂培地上(30℃, 48hr)

直径1mmの円形で黄色コロニーを形成する

ゼラチン液化 + (弱い)

#### 生理的性質

カタラーゼ +

オキシダーゼ + (弱い)

カゼイン分解 +

セルロース分解性 +

キサンテンの分解 -

食塩耐性 1%以下 生育

10%以上 生育しない

クエン酸の利用 -

色素の菌体外生成 -

細胞壁分析 リジンを含む

生育の温度範囲 20~45℃(33℃が良好)

生育のpH範囲 6.5~6.5(7.2が良好)

酸素に対する態度 通性嫌気性

O-Fテスト 陽性性(1/23-2)

第2表 炭素源の炭化価

グリセリン	+	酢酸	+
アラビノース	+	グルコン酸	+
リボース	+	乳酸	+
グルコース	+	プロピオン酸	+
ガラクトース	+	クエン酸	-
フルクトース	+	セロビオース	+

以上の菌学的性質から分類学上、本菌株は「E. Stachlebrandtら、361. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. C3, 101-109頁、1962年」に記載されているセルロモナス・フルバクの性状に類似する。従って本菌株はセルロモナス・フルバクであると判断し、セルロモナス・フルバク・~~strain~~ [27]と命名し、工研発第9652号として登録されている。

本菌を用いて新規な $\alpha$ -HSDHを製造する方法について述べる。

培地は炭化性炭素および炭素その他無機物、ビ

タミン、アミノ酸、酵母エキス等を含む微生物の培養に通常用いられる培地が広く使用される。

炭素源として例えばグルコース、ガラクトース、アラビノース、スクロース、フルクトース、ソルボース、ソルビトール、グリセリン、エタノール等が挙げられる。炭素源として例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイプリカー、炭芽エキス、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、塩化アンモニウム等が挙げられる。無機塩として例えばリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等が挙げられる。

これらの成分を含む培地を用いて20~45℃好ましくは30~35℃で、培地のpHは5.5~6.5好ましくはpH7~7.5で18~100hr、微好気的条件下で培養する。菌を培養して得られた培養物から当該酵素を抽出するには、公知の種々の処理方法を用いることができる。例えば遠心分離あるいは、ろ過等の通常の方法で菌体を分離したのち、生菌体あるいはアセトン乾燥処理菌体、凍結乾燥処理菌体を目玉消化、フレンチプレス、ダイノミル、超音波処

理等によって細胞を破壊したのち菌体抽出液を得る。菌体抽出液から当該酵素を分離・精製するには、硫酸塩析(20~80%飽和百分)して得た沈殿物を1/30Mトリス緩衝液(pH7.0)に溶解し、脱塩後この抽出液をあらかじめ同じ緩衝液で平衡化したDEAE-セファロース等の陰イオン交換体元層カラムに通し、当該酵素を吸着させる。次に同じ緩衝液中で塩化カリウム濃度を段階的に上昇させる溶出法によってクロマトグラフィーを行うと、塩化カリウム濃度0.15Mで本酵素は溶出される。当該酵素を含む活性画分は、公知の種々の精製法、例えばゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等によりさらに精製される。

#### 〔当該酵素の理化学的性質〕

本発明により製造される新規な $\alpha$ -HSDHの理化学的性質を以下に示す。

#### a. 作用

当該酵素はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)の存在下(アルカリ条件が好ましい)で1モルの $5\alpha$ -アンドロスタン- $3\alpha$ -オール-

17-オン(アンドロステロン)あるいは $\Delta$ メノールなどの基質を、1モルの $5\alpha$ -アンドロスタン-3,17-ジオンおよび $\Delta$ メノンにそれぞれ変換する。一方、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)存在下(酸性条件が好ましい)では、1モルの $5\alpha$ -アンドロスタン-17 $\beta$ -オール-3-オン(1,5-ジヒドロテストステロン)あるいは $\Delta$ メノンなどの基質を、1モルの $5\alpha$ -アンドロスタン-3,17-ジオールおよび $\Delta$ メノールに変換する。その他カルボニル基を持った種々の化合物を対応するアルコールに変換し、さらにその逆反応も行う。

#### b. 基質特異性

第3表に示したように、3位にケトンを持つステロイド化合物や $\Delta$ メノン、1-クロロアセト酢酸エチルなどをNADHの存在下で還元する。しかし不飽和ケトンを含む $5\alpha$ -アンドロスタン-3,17-ジオンやプレドニソロンに対しては活性がない。

第3表 種々の基質に対する還元能

基 質	濃度 (mM)	活性 (%)
5 $\alpha$ -7 $\gamma$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -17 $\beta$ - $\Delta^4$ -3- $\Delta^1$	0.24	100
5 $\alpha$ -7 $\gamma$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3,17- $\Delta^4$	0.24	43
5 $\beta$ -7 $\gamma$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3,17- $\Delta^4$	0.17	?
7 $\alpha$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$	0.16	0.05
4-7 $\gamma$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3,17- $\Delta^4$	0.24	0
7 $\alpha$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$	0.14	0
4-7 $\gamma$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3,17- $\Delta^4$	0.1	26
1- $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3- $\Delta^1$	0.24	4.6
3- $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -2- $\Delta^1$	5	1.4
4- $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3- $\Delta^1$	45	0.2
2- $\Delta^5$ - $\Delta^7$ - $\Delta^4$ - $\Delta^1$	14.5*	1.8
$\Delta^5$ - $\Delta^7$	2.4	0.3

基質はエタノールに溶解して(エタノールの最終濃度は10%)、1/15M 酢酸緩衝液(pH4.5)中、30℃で反応した。

\* 緩衝液中に完全溶解して反応した。

\*\* 4 $\Delta^5$ - $\Delta^7$ - $\Delta^4$ の状態では反応した。

7 $\alpha$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$	0.16	4.5
(+)-5- $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3- $\Delta^1$	36*	10.4
3 $\Delta^5$ - $\Delta^7$	9.3	2.6
4 $\Delta^5$ - $\Delta^7$	2.3	0.18

基質はエタノールに溶解して(エタノールの最終濃度は10%)、1/15M 酢酸緩衝液(pH4.5)中、30℃で反応した。

\* 4 $\Delta^5$ - $\Delta^7$ - $\Delta^4$ の状態では反応した。

\*\* 緩衝液中に完全溶解して反応した。

#### c. Km値 (ミハニリス定数)

当該酵素のKm値は5 $\alpha$ -アンドロスタン-17 $\beta$ -オール-3オンが0.29mMであり、メントンは14.9mMであった。いずれも0.15mM NADH存在下、1/15M酢酸緩衝液(pH4.5)中、30℃で測定した。

#### d. 金属イオン等の影響

金属イオンおよびその他の添加物(すべて終濃度3mM)が酵素活性に及ぼす影響を調べた。第5表に示すようにPb、Cuイオンが阻害した。

(以下空白)

また第4表に示すように3 $\alpha$ 位にヒドロキシル基を有するステロイド化合物や種々のヒドロキシ化合物などをNADの存在下で酸化した。5 $\alpha$ -7 $\gamma$ -ドロスタン-3 $\alpha$ -オール-17-オンに対する活性が最も高いが、類似の5 $\alpha$ -7 $\gamma$ -ドロスタン-3 $\beta$ -オール-17-オンのような3 $\beta$ -オール構造のステロイドには全く作用しなかった。

第4表 種々の基質に対する酸化能

基 質	濃度 (mM)	活性 (%)
5 $\alpha$ -7 $\gamma$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3 $\alpha$ - $\Delta^1$ -17- $\Delta^4$	0.24	100
5 $\alpha$ -7 $\gamma$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3 $\alpha$ -17 $\beta$ - $\Delta^4$	0.24	81
5 $\alpha$ -7 $\gamma$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3 $\beta$ - $\Delta^1$ -17- $\Delta^4$	0.24	0
7 $\alpha$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3- $\Delta^1$	0.17	2.1
7 $\alpha$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3- $\Delta^1$	0.17	2.1
3- $\Delta^5$ - $\Delta^7$	0.17	0.5
4- $\Delta^5$ - $\Delta^7$	2.5	0.14
17 $\alpha$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$	300	0.25
4- $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -2- $\Delta^1$ -17- $\Delta^4$	150**	4.2

第5表 金属イオンその他の添加物の影響

HgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	100*	CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	76
CoSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	98	7 $\alpha$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$	105
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	95	7 $\alpha$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3 $\alpha$ - $\Delta^1$	105
ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	95	7 $\alpha$ - $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -3 $\beta$ - $\Delta^1$	99
BaCl	100	3 $\alpha$ - $\Delta^1$ -17 $\beta$ - $\Delta^4$	96
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	96	EDTA	100
PbSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	67	無添加	100

\* 無添加を100としたときの相対値

#### e. 反応至適pH

メントンを基質として、NADHの存在下で反応至適pHを調べた。至適pHは4.6~5.5(1/15M酢酸緩衝液中)であった。またNADの存在下で、5 $\alpha$ -7 $\gamma$ -ドロスタン-3 $\alpha$ -オール-17-オンを基質とした場合の反応至適pHは7.5~8.5(1/15Mリン酸緩衝液およびトリス-HCl緩衝液)であった。

#### f. 安定pH範囲

当該酵素はpH6~8(1/15Mリン酸緩衝液中)で30℃、24hr放置しても安定である。またpH7.0、30℃で

2. 100hr放置したとき、50%の活性が残存している。

#### g. 安定温度範囲

1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)中で、温度を変えて安定性を調べた。当該酵素は、60℃以下の温度で2hr保温したとき失活は全く認められない。

#### h. 精製方法

精製方法を第6表に示す。菌体破砕後、プロタミン処理、硫酸沈殿、イオン交換クロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーを行うことによって、電気泳動的に均一な酵素を得ることができる。なお酵素活性は0.24u、5 $\alpha$ -アンドロスタン-17 $\beta$ -オール-3-オン、0.15mM NADHの存在下、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)中で測定した。酵素の力価は30℃、1分間に1 $\mu$ molのNADHを減少(340nmで追跡)させる量を1単位とした。酵素の精製結果を第10表にまとめた。

(以下空白)

#### 1. 分子量

ネイティブ・ポリアクリルアミド電気泳動に於ける当該酵素の分子量は98,000であった。またSDS電気泳動における分子量は24,000であった。従って当該酵素は4つのサブユニットから成ると考えられる。

#### 2. 紫外線吸収スペクトル

当該酵素の紫外線吸収スペクトルを第1図に示した。

$\lambda_{max}$ : 275nm, 280nm

肩 : 260nm付近, 270nm付近

#### 3. 結晶構造および元素分析

現在までのところでは晶出するに至らず、したがって元素分析も行うことができない。

#### [当該酵素の新規性]

#### a. 基質特異性

シクロヘキサノンを還元する酵素は馬肝臓由来のアルコール脱水素酵素[EC 1.1.1.1]が知られている。しかし当該酵素はエタノールに対する活性

第6表 新規な3 $\alpha$ -HSDHの精製方法

画分	分離方法、条件
1. 培養液	
↓	遠心分離 (9,000rpm, 15分)
2. 菌体	
↓	菌体破砕 (5' / 1/16 (10分))
↓	遠心分離 (10,000rpm, 30分)
3. 細胞抽出液	
↓	プロタミン処理 (0.25%)
↓	硫酸沈殿 (20~30飽和%)
4. 硫酸沈殿画分	
↓	透析 (pH7.0, 1/15M リン酸緩衝液)
5. 透析液	
↓	DEAE-27.0-2.7075' 574-
6. 活性画分 (0.1M KC1 溶出画分)	
↓	Blue A-2.7075' 574-
7. 精製酵素 (0.1M KC1 溶出画分)	

は無くアルコール脱水素酵素には該当しない。一方、当該酵素は3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドに対する活性が高く、既知の3 $\alpha$ -HSDHに類似している。しかし、シュールドモナス・テストステロン由来の3 $\alpha$ -HSDH (シグマ社製、人酵素と略す) やシュールドモナス・ブチゲ由来の3 $\alpha$ -HSDH (B酵素と略す) などの既知の酵素と比較すると、第7表に示すように基質特異性に違いが見られる。

(以下空白)



第7表 既知酵素との基質特異性の比較

基 質	当該酵素	A 酵 素	B 酵 素
1. 3 $\alpha$ -7 $\beta$ -HSDH			
3 $\alpha$ -HSDH	100	100	100
2. 3 $\beta$ -HSDH	1.1	43	-
3. 4 $\beta$ -HSDH	2.1	18	348
4. 3 $\alpha$ -HSDH	6.5	90	275
5. 4 $\alpha$ -HSDH	4.9	0.3	-
6. 5 $\alpha$ -7 $\beta$ -HSDH			
5 $\alpha$ -HSDH	100	100	-
7. 5 $\beta$ -7 $\beta$ -HSDH			
5 $\beta$ -HSDH	44	107	-
8. 4 $\alpha$ -HSDH	25	0.2	-

\* 3 $\alpha$ -HSDH: ATCC11996由来の3 $\alpha$ -HSDH\*\* 4 $\beta$ -HSDH: KY667(特開昭53-99392から引用した)由来の4 $\beta$ -HSDH

\*\*\* 比較データなし

No1~5: pH5.8における基質の酸化活性(No1=100)

No6~8: pH4.5における基質の還元活性(No6=100)

性はA酵素に比べて高いことがわかった。

c. 分子量・反応至適pH・熱安定性

分子量等について当該酵素と既知酵素との比較を行った。第8表に示すように、本酵素はA酵素およびC酵素(シュードモナス・スフレリカス由来の3 $\alpha$ -HSDH)とは異なった性質を持っていた。

第8表 既知酵素との比較

	当該酵素	A 酵 素	C 酵 素
分子量	98,000	47,000	155,000
反応至適pH	7.5~8.5	11~11.5	10~10.5
熱安定性***	100	0	記載なし

\* 3 $\alpha$ -HSDH: ATCC11996由来\*\* 4 $\beta$ -HSDH: KY667由来(特開昭53-99392から引用)

\*\*\* 数値は1/100リン酸緩衝液(pH7.0)中、50℃で10分間保温した後の残存活性を示す。

すなわち分子量は三者で大きく異なること、反応至適pHはA酵素、C酵素ともに当該酵素に比べ

すなわち3 $\alpha$ -アンドロスタン-3 $\alpha$ -オール-17-オン(3 $\alpha$ -アンドロステロン)の酸化活性を100としたとき、当該酵素が有するコール酸ナトリウム、コール酸およびデオキシコール酸の酸化活性はA酵素やB酵素に比べて低いが、4-メチルペンタノールに対する酸化活性はA酵素より高い。一方、3 $\alpha$ -アンドロスタン-17 $\beta$ -オール-3-オン(4 $\beta$ -デヒドロテストステロン)の還元活性を100としたとき、当該酵素の4-クロロアセト酢酸エチル還元活性はA酵素に比べて100倍以上高い。このように基質特異性が大きく異なるのは、それぞれの酵素のアクティブサイトに違いがある、すなわち酵素のアミノ酸配列が異なっていることを強く示唆しており、これらの酵素は互いに違った構造を有していると考えられる。

b. 立体選択的還元性

メントンをA酵素で還元したときの生成物はメントール:ネオメントール=1:2である。一方、当該酵素を用いた場合はメントール:ネオメントール=97:3であり、当該酵素の立体選択

アルカリ側に溶け、また当該酵素は60℃、10分間加熱後も100%の活性が残存するが、A酵素は、全く活性を失うので、熱安定性は当該酵素の方が高いこと(第2図参照)などである。

以上に記述したように、当該酵素は既知の3 $\alpha$ -HSDHと比べて、3 $\alpha$ -アンドロスタン-3 $\alpha$ -オール-17-オンに対して活性が高いという共通点があるが、基質特異性、立体選択性、分子量、反応至適pH、熱安定性において何れも違いが見られる。従って当該酵素を新規の3 $\alpha$ -HSDHと命名することが適当である。

【実施例】

以下の培養は全て30℃、pH7.2で行った。セルロース・ツルバタ・~~1059号~~ (微生物菌 1059号)を、500mL容フラスコ(第9表に示した)に100mLを含むに播菌し、48hr培養した。なお培養時、培養基質としてメントン(0.05mL)を2回に分けて添加した(添加したメントンはエタノールと体積比で1:1の混合液とした)。この培養液を2Lビジャー・ファーマンター(同培地を1L含む)に移し、

回転数400rpm、通気量0.05v/vで48hr培養を行った。メントンはフラスコ培養と同様の方法で分離した。次に培養終了液を、50L容ジャーフェーマンター（同培地20Lを含む）に移し、200rpm、通気量0.05v/vで、さらに50hr培養を行った。培養途中で100mLの25%D-アラビノースを4回分添した。またメントンは前培養と同様エタノールとの混合液25mLを4回分添した。この培養曲線を用いて、第6表に示す方法によって、当該酵素の精製を行った。精製過程を第10表にまとめた。

第9表 培地組成

BH <sub>4</sub> HO <sub>3</sub>	0.1g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10mg
Ba <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.9g	Ba <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.5mg
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90mg	FeSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.5mg
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1g	Yeast Extract	1.0g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50mg	D-75t <sup>1</sup> /1-1	0.5g

培養水 100ml、pH7.2

pH7.0)に溶解したものと、メントール0.1mL(576μt)およびメチルイソブチルカルビノール0.1mL(775μt)とを混ぜて、30℃で4hr反応を行った。反応後の液に0.5mLのヘキサンを添加し、ヘキサン相をガスクロマトグラフィーで分析した(R2-20Hカラム, 100℃, ヘリウム 50mL/min)。反応液中には添加したNADHのほぼ170倍に相当するメントール10.7μtとメチルイソブチルケトン20.8μtが検出された。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は当該酵素の紫外線吸収スペクトルを示す。第2図は当該酵素(●-●)および既知のα-HSDH(○-○)の安定温度範囲を示す。何れも各温度で、1/15M磷酸緩衝液(pH7.0)中、10分間保温後の残存活性を示す。

出版人 工業技術院長

坂根 孝三

指定代理人 工業技術院生物工学技術研究所長

佐藤 隆雄

第10表 酵素精製結果

分画液	総活性 (Unit)	比活性 (U/mg)	回収率 (%)
細胞抽出液	19500	0.40	100
プロタミン処理液	16500	0.48	88
硫酸分画液	15500	0.68	81
DEAE-5710-2抽出画分	9750	15.3	51
BlueA 37A抽出画分	6470	20.6	44

#### 実施例2

当該酵素は、メチルイソブチルカルビノールを基質に用いた場合、NADHの再生を行うことができる。そこで、補酵素再生系の存在下でメントンからメントールの生産を行った。

実施例1で調製した精製酵素を0.1単位(1単位は30℃、pH4.5の1/15M磷酸緩衝液中で、1分間に1μtのメントールを生成する酵素量とする)およびNADH 0.1μtを0.1mLの1/15M磷酸緩衝液(

図1

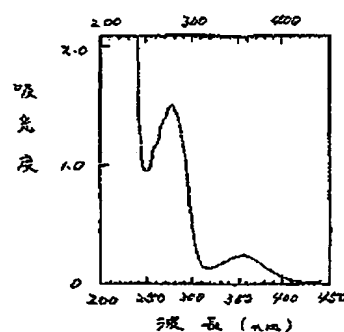
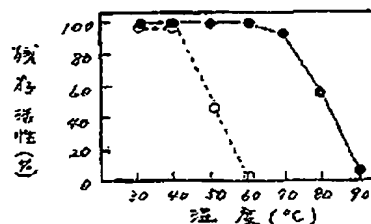
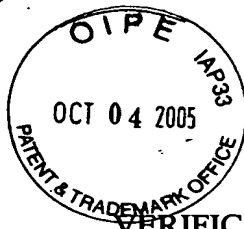
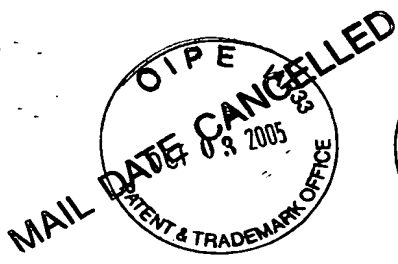


図2





VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Shoko Takizawa

of 6th Fl., Kantetsu Tsukuba-Science-City Bldg. 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura, Ibaraki, JAPAN

declare as follows:

1. That I am well acquainted with both the English and Japanese languages, and
2. That the attached document is a true and correct partial translation of Japanese Kokai Publication No. H01-277494 (the translated portion is marked A), which was made by me to the best of my knowledge and belief.

September 5, 2005

(Date)

Shoko Takizawa

(Signature of Translator)

**Partial Translation of Japanese Patent Application****Kokai Publication No. H01-277494****[Examples]****Example 1: Production of optically active 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester**

In 18 ml of 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.2M NaCl, dissolved were 1.5 g (8.33 mmol) of glucose, 7 mg of 3 $\alpha$ -HSDH (purified enzyme produced by KE31 strain, 20U/mg protein), 2.5 mg of GDH (40U/mg protein) to serve as an enzyme for NADH regeneration, and 191 mg (0.25 mmol) of NADH. This was mixed with 1.2 g (7.29 mmol) of ethyl 4-chloroacetoacetate and the mixture was well stirred at 20°C to allow the reaction to proceed. Since the pH value lowered as the reaction proceeded, the pH value was adjusted to 7.0 with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> for the continuous reaction. After 3.5-hour reaction, ethyl acetate (20 ml x 2) was added to the reaction mixture to extract the product. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to the extract, moisture was removed, then molecular sieve was added for desiccation. Ethyl acetate that contaminated the product was removed under reduced pressure to obtain 750 mg (4.5 mmol) of 4-chloro-3-hydroxybutyric acid ethyl ester. This product was derivatized with 3,5-dinitrophenylisocyanate (DNPI) and analyzed by liquid chromatography (column: OA-2100, Sumitomo Chemical Co., Ltd.; eluent: hexane/chloroform/ethanol = 50/15/1; flow rate: 1 ml/min). The 3-hydroxy compound obtained by the above enzymatic reaction contained 99.1% of 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester and 0.9% of 4-chloro-3(R)-hydroxybutyric acid ethyl ester. Thus, the 3(S) hydroxy compound was preferentially produced. The yield of 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester was 62%.

**Example 2: Production of optically active 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester**

3 $\alpha$ -HSDH (the same purified enzyme as used in Example 1) was used as an enzyme for NADH regeneration and methylisobutylcarbinol was used as a substrate for NADH regeneration. 3 $\alpha$ -HSDH (2.33 mg) and 25  $\mu$ l of 5 mM NADH (0.125  $\mu$ mol) were added to 25  $\mu$ l of 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) and dissolved therein. After adding 260  $\mu$ l of methylisobutylcarbinol and 40  $\mu$ l (295  $\mu$ mol) of ethyl 4-chloroacetoacetate, the mixture was allowed to react at 30°C under stirring. Six hours after the initiation of the reaction, 40  $\mu$ l of ethyl 4-chloroacetoacetate was added. Then, 21 hours after

the reaction was initiated, 40  $\mu$ l of ethyl 4-chloroacetoacetate, 260  $\mu$ l of methylisobutylcarbinol, and 10  $\mu$ l of phosphate buffer were added to allow the reaction to proceed further 60 hours (the total reaction time was 81 hours). After the completion of the reaction, gas chromatographic analysis was performed. The result revealed the production of 810  $\mu$ mol of the 3-hydroxy compound. Methylisobutylcarbinol and methylisobutyl ketone, which contaminated the solution, were removed at 40°C under reduced pressure, followed by isomer purity measurement by liquid chromatography and rotation measurement. When dissolved in chloroform, specific rotation was  $[\alpha]_{589}^{25} = -20.63$  deg, indicating the preferential production of 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester. Liquid chromatographic analysis of the product derivatized with DNPI revealed the production of 99% of 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester and 1% of 4-chloro-3(R)-hydroxybutyric acid ethyl ester. The yield of 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester was 91%.

#### Example 3: Production of optically active 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester

The reaction was allowed to proceed as in Example 2 with adding 70 mg of swelled DEAE-Sepharose to improve the enzymatic reaction rate and stability of the enzyme. After the reaction completed, the reaction mixture was analyzed by gas chromatography, indicating the production of 860  $\mu$ mol of the 3-hydroxy compound. Isomer purity measurement by liquid chromatography and rotation measurement were performed following removal of methylisobutylcarbinol and methylisobutyl ketone. When dissolved in chloroform, specific rotation was  $[\alpha]_{589}^{25} = -20.71$  deg, indicating the preferential production of 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester. The product derivatized with DNPI was analyzed by liquid chromatography and the results revealed the production of 99.2% of 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester and 0.8% of 4-chloro-3(R)-hydroxybutyric acid ethyl ester. The yield of 4-chloro-3(S)-hydroxybutyric acid ethyl ester was 97%.

#### Example 4: Production of optically active R-(-)-2-octanol

In 1 ml of 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.2M NaCl, dissolved were 0.51 g (2.83 mmol) of glucose, 1 mg of 3 $\alpha$ -HSDH (purified enzyme produced by KE31 strain), 2.6 mg of GDH, and 10 mg of NADH (13  $\mu$ mol). This was mixed with 0.1 ml (82 mg, 640  $\mu$ mol) of 2-octanone and the reaction was allowed to proceed at 25°C. Since the pH value lowered as the reaction proceeded, the reaction was performed while

continuously stirring with a stirrer and adjusting the pH value to 7.0 with 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> for the continuous reaction. After 15-hour reaction (1 mg of GDH and 6 mg of NADH were added after 6-hour reaction), 1,2-dichloroethane (1.5 ml x 2) was added to the reaction mixture to extract the product. After centrifugation, the 1,2-dichloroethane layer (oily layer) was recovered and analyzed by gas chromatography. In the oily layer, 64 mg (490  $\mu$ mol) of 2-octanol was produced. Rotation of the product was measured and, as a result, specific rotation was  $[\alpha]^{25}_{589} = -6.7$  deg, indicating the preferential production of the R compound. On the other hand, specific rotation of a purified product of R-(-)-2-octanol was  $[\alpha]^{25}_{589} = -9.745$  deg. Then, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to the above-mentioned oily layer and the mixture was stirred overnight. After 0.3 ml was taken from the mixture, molecular sieve was added thereto and the mixture was allowed to stand another overnight. DNPI (3mg) was added to this solution and the mixture was well stirred. Then, 30  $\mu$ l of dry pyridine was added, the mixture was stirred and allowed to stand for 4 hours. The derivative thus obtained was analyzed by liquid chromatography. As a result, 2-octanol thus produced included 84.5% of R-(-)-2-octanol and 15.5% of S-(+)-2-octanol. The yield of R-(-)-2-octanol was 67%.

#### Example 5: Production of optically active 2-methyl-4(S)-hydroxypentane

In 2.8 ml of 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.1M NaCl, dissolved were 1.99 g (11.1 mmol) of glucose, 2.6 mg of 3 $\alpha$ -HSDH (purified enzyme produced by KE31 strain), 2.7 mg of GDH, and 20 mg of NADH (26  $\mu$ mol). This was mixed with 0.6 ml (480 mg, 4.97 mmol) of methylisobutyl ketone and the reaction was allowed to proceed at 25°C while adjusting the pH value to 7.0. After 15-hour reaction (2 mg of GDH and 12 mg of NADH were added after 6-hour reaction), 1,2-dichloroethane (2.5 ml x 2) was added to the reaction mixture to extract the product. After centrifugation, the 1,2-dichloroethane layer (oily layer) was recovered and analyzed by gas chromatography. The result revealed that 215 mg of methylisobutylcarbinol was produced. Rotation of the product was measured and, as a result, specific rotation was  $[\alpha]^{25}_{589} = +0.127$  deg. The product was derivatized with DNPI and isomer purity of the derivative was analyzed by liquid chromatography. As a result, the product contained 62.4% of 2-methyl-4(S)-hydroxypentane and 37.6% of 2-methyl-4(R)-hydroxypentane. Thus, the 4(S)-hydroxy compound was preferentially produced. The yield of 2-methyl-4(S)-hydroxypentane was 27.8%.

## ⑫ 公開特許公報(A)

平1-277494

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)11月7日

C 12 P 7/02  
 // C 12 N 9/04  
 (C 12 N 9/04  
 C 12 R 1:01)

6926-4B  
 Z-7823-4B

審査請求 有 請求項の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 光学活性アルコールの製造方法

⑯ 特 願 昭63-103851

⑰ 出 願 昭63(1988)4月28日

⑱ 発 明 者 木 瀬 昇 一 山口県玖珂郡和木町和木6丁目1番2号 三井石油化学工業株式会社内

⑲ 発 明 者 林 田 幹 夫 山口県玖珂郡和木町和木6丁目1番2号 三井石油化学工業株式会社内

⑳ 出 願 人 工 業 技 術 院 長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

光学活性アルコールの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を用いて、ケトン化合物を光学活性アルコールに変換することを特徴とする光学活性アルコールの製造方法。

(2) 3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素がセルロモナス属由来の酵素である請求項1記載の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を作用させることを特徴とする光学活性アルコールの新規な製造方法に関するものである。

〔従来の技術〕

光学活性アルコールは医薬、農薬、生理活性物質の合成中間体および強誘電性材料に用いられている。たとえば4-クロロ-3(5)-ヒドロキシ

タン酸エチルの誘導体であるD-カルニチンはカルニチンアセチルトランスフェラーゼを拮抗的に阻害するような生理活性を有する。また光学活性なR-(-)-2-オクタノールや2-メチル-4(S)-ヒドロキシペンタンは強誘電性材料の素材に用いることができる。

従来、ケトン化合物を光学活性なアルコールに変換する方法としては、化学触媒を用いる方法、あるいは生体触媒を用いる方法が知られている。化学触媒を用いる方法はNaBH<sub>4</sub>やLiAlH<sub>4</sub>を用いて還元した場合、光学収率が非常に低くラセミ体ができる。すなわちこのラセミ体を酒石酸やD-マンデル酸のような光学分割剤を用いて光学分割したのち、光学活性なアルコールを得るという複雑なステップを踏まざるを得ない。また最近では光学活性な配位子を持ったキラル触媒を用いて光学活性なアルコールを得ようと試みられているが、極低温で反応する必要のあることやキラル触媒が高価でかつ再生が困難であることが問題となっている。

一方、微生物、植物、動物などの生体触媒を用いる方法は、一般に光学収率が高いという利点を有する。たとえば4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルは「アニュアル・ニューヨーク・アカデミック・サイエンス 434巻、186-193(1984)」に記載されているように、種々の微生物によって発酵生産されることが明らかになっている。

〔発明が解決しようとする課題〕

このように化学触媒を用いて光学活性なアルコールを合成するのは、現在のところ技術的に困難な問題が横たわっている。一方、微生物による発酵生産の方法では原料あるいは生産物による菌体の成育阻害が起こるため、原料を多く仕込めないという問題点がある。また発酵液から生産物を採取する際、副産物を除去しなければならないなど精製に手間がかかるという問題点がある。

本発明の目的は、このような問題点を解決し、副産物が少なく、効率よく光学活性アルコールを製造する方法を提供することである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは微生物由来の酵素を用いて、光学活性なアルコールを製造する方法を鋭意検討した結果、3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を用いれば効率よくケトン化合物を光学活性なアルコールに変換することを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を用いて、ケトン化合物を光学活性アルコールに変換することを特徴とする光学活性アルコールの製造方法である。

本発明に使用する3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素（以後3 $\alpha$ -HSDHと略す）は、セルモナス・ツルバタKE31株（微工研菌寄第9059号）由来のものが好ましいが、これに限定されない。この酵素は、特願昭62-69598号に記載されている精製法によって純品のものが得られる。この純品の酵素はもちろん使用することができるが、硫酸分画あるいはDEAE-セファロースクロマトグラフィーで得られる半精製品も使うことができる。このような酵素を用いて光学活性なアルコールを製

3

造するにあたり、例えば精製酵素0.01~200mgをpH5.5~8.0、好ましくはpH6.5~7.5の0.1Mリン酸緩衝液1mlにとかし、原料のケトン化合物（例えば4-クロロアセト酢酸エチル、2-オクタノン、メチルイソブチルケトンなど）および原料と等モルの還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）を添加する。この反応では、添加したNADHは酸化されてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）になるため、生産物と等モルのNADHを加える必要がある。しかし、高価なNADHを有効に利用するためには、NADをNADHにするような酵素、例えばグルコース脱水素酵素（以下GDHと略す、アマノ製薬社製）や耐熱性のグルコース-6-リン酸脱水素酵素（ユニチカ社製）、蟻酸脱水素酵素（天野製薬社、ベーリンガー社、メルク社製など）、あるいは3 $\alpha$ -HSDH（KE31株由来精製酵素やシグマ社製）などを共存させれば原料の1/10~1/10,000モルのNAD（H）を添加するだけで反応させることもできる。ケトン化合物の添加量は、

5

4

その種類によって異なるが、酵素重量の約10~100倍である。これらを加えて、15~40℃、好ましくは25~35℃で1時間から1週間攪拌しながら反応を行う。反応液にアエロゾルOTやツィーン80などの界面活性剤を添加した場合、より効率良く反応させることができる。またDEAE-セファロースやデュオライトA561のようなイオン交換樹脂を反応系に加えることによって、反応速度を向上させたり酵素を安定に保ちながら反応を続けることもできる。反応の経時変化をガスクロマトグラフィー（PEG20Mキャピラリーカラム、25m、50→150℃、10℃/minで昇温分析）で追跡し、原料がほぼ失くなった時点で反応を止め、遠心分離することによって、水層を分け生成物を採取する。回収率を高めるためには水中に溶けている生産物を酢酸エチル、ヘキサン、ジエチルエーテル、1,2-ジクロロエタン、クロロホルムなどの溶媒を用いて抽出する。精製品が必要であれば、これらの生産物を蒸留等によって精製し、目的の光学活性なアルコールを得ることができる。

6



## 〔実施例〕

## 実施例 1. 光学活性 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの製法

0.2M NaCl を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 18ml に 1.5g (8.33 ミリモル) のグルコース、7mg の 3 $\alpha$ -HSDH (KE31 株由来の精製酵素、20U/mg 蛋白)、NADH 再生用酵素として 2.5mg の GDH (40U/mg 蛋白) および 191mg (0.25 ミリモル) の NADH を溶かし、これに 1.2g (7.29 ミリモル) の 4-クロロアセト酢酸エチルを添加して良く攪拌しながら 20℃ で反応した。反応が進むにつれて pH が低下するので、1M の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で pH を 7.0 に調整し反応を続けた。3.5 時間反応後、反応液に酢酸エチル (20ml × 2 回) を加えて生成物を抽出した。抽出液に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を入れて水分を除去した後、さらにモルキュラーシーブを加えて乾燥した。標品に混在する酢酸エチルを減圧下で除去し、750mg (4.5 ミリモル) の 4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エチルを得た。これを 3.5-ジニトロフェニルイソシアネート (以下 DNPI と略す) で誘

導体化したあと液体クロマトグラフィー (カラム: OA-2100, 住友化学製、溶媒: ヘキサン/クロロホルム/エタノール = 50/15/1、流速 1ml/min) によって分析した。上述の酵素反応によって生成した 3-ヒドロキシ体中には 99.1% の 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルと 0.9% の 4-クロロ-3(R)-ヒドロキシブタン酸エチルが含まれており、3(S)-ヒドロキシ体が優先的に生成した。4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの収率は 62% であった。

## 実施例 2. 光学活性 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの製法

NADH 再生用酵素として 3 $\alpha$ -HSDH (実施例 1 と同様の精製酵素)、NADH 再生用基質としてメチルイソブチルカルビノールを用いた。25 $\mu$ l の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 2.33mg の 3 $\alpha$ -HSDH および 25 $\mu$ l の 5mM NADH (0.125 $\mu$ モル) を加えて溶解し、260 $\mu$ l のメチルイソブチルカルビノールおよび 40 $\mu$ l (295 $\mu$ モル) の 4-クロロアセト酢酸エチルを加えて攪拌しながら 30℃ で

7

反応した。反応開始後 6 時間目に 40 $\mu$ l の 4-クロロアセト酢酸エチル、21 時間目には 40 $\mu$ l の 4-クロロアセト酢酸エチルおよび 260 $\mu$ l のメチルイソブチルカルビノール、10 $\mu$ l のリン酸緩衝液を加えて、さらに 60 時間反応を続けた (総反応時間は 81 時間)。反応終了後、ガスクロマトグラフで分析した結果、810 $\mu$ モルの 3-ヒドロキシ体が生成していた。この溶液に混在するメチルイソブチルカルビノール、メチルイソブチルケトン を減圧下 40℃ で除去したあと、旋光度の測定及び液体クロマトグラフによって異性体純度の測定を行った。クロロホルムに溶かした場合の比旋光度は  $[\alpha]_D^{25} = -20.63 \text{ deg}$  であり 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルが優先的に生成していた。また DNPI で誘導体化した標品を液体クロマトグラフで分析した結果、99% の 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルと 1% の 4-クロロ-3(R)-ヒドロキシブタン酸エチルが生成していた。4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの収率は 91% であった。

8

## 実施例 3. 光学活性 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの製法

酵素の反応速度および安定性を高めるために 70mg の膨潤状態の DEAE-セファロースを添加して、実施例 2 と同様にして反応を行なった。反応終了液をガスクロ分析したところ 860 $\mu$ モルの 3-ヒドロキシ体が生成していた。またメチルイソブチルカルビノール、メチルイソブチルケトン を除去したあと、旋光度の測定および液体クロマトグラフによって異性体純度の測定を行った。クロロホルム中における比旋光度は  $[\alpha]_D^{25} = -20.71 \text{ deg}$  であり 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルが優先的に生成していた。また DNPI 誘導体を液体クロマトグラフで分析した結果、99.2% の 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルと 0.8% の 4-クロロ-3(R)-ヒドロキシブタン酸エチルが生成していた。4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの収率は 97% であった。

実施例 4. 光学活性 R-(-)-2-オクタノールの製法

9

10

0.2M NaCl を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 1 ml に0.51g(2.83ミリモル)のグルコース、1 mg の3 $\alpha$ -HSDH (KE31株由来の精製酵素、2.6 mg のGDH および10mgのNADH (13 $\mu$ モル) を溶かし、これに0.1 ml (82mg, 640 $\mu$ モル) の2-オクタノンを添加して25℃で反応を行った。反応と共に、pH は低下するので絶えずスターラーで攪拌し、1M のNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で、pH 7.0 に調整しながら反応させた。15時間反応後(途中6時間目に1 mg のGDH および6 mg のNADH をさらに添加した)、反応液に1,2-ジクロロエタン(1.5ml $\times$ 2回)を加えて生産物を抽出した。遠心分離後1,2-ジクロロエタン層(油層)を回収し、ガスクロマトグラフを用いて分析した。油層中には64mg(490 $\mu$ モル)の2-オクタノールが生成していた。この標品の旋光度を測定したところ、比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = -6.7 \text{ deg}$ でありR体が優先的に生成していた。一方、純品のR-(-)-2-オクタノールの比旋光度は $[\alpha]_D^{25} = -9.745 \text{ deg}$ であった。次に前述の油層に1.6 g のNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて1夜、攪拌し

たのち0.3 ml採取してモルキュラシーブを入れてさらに1夜放置した。この液に3 mg のDNPIを加えてよく攪拌し、さらに30 $\mu$ lの乾燥ピリジンを加えて攪拌したのち4時間放置した。この誘導体を液体クロマトグラフィーで分析したところ、生成した2-オクタノールのうち84.5%はR-(-)-2-オクタノールであり、15.5%はS-(+)-2-オクタノールであった。R-(-)-2-オクタノールの収率は67%であった。

#### 実施例5. 光学活性2-メチル-4(S)-ヒドロキシペンタンの製法

0.1M NaCl を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 2.8 ml に1.99g(11.1ミリモル)のグルコース、2.6 mg の3 $\alpha$ -HSDH (K31E株由来精製酵素)、2.7 mg のGDH および20mgのNADH (26 $\mu$ モル) を溶かし、これに0.6 ml (480mg, 4.97ミリモル) のメチルイソブチルケトンを加えてpH 7.0 に調整しながら25℃で反応を行なった。15時間反応後(途中6時間目に2 mg のGDH および12mgのNADH をさらに添加した)、反応液に1,2-ジクロ

1 1

ロエタン(2.5 ml $\times$ 2回)を加えて抽出し、遠心分離して1,2-ジクロロエタン層(油層)を回収した。これをガスクロマトグラフで分析したところ215mg のメチルイソブチルカルビノールが生成していた。この標品の旋光度を測定したところ、比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +0.127 \text{ deg}$ であった。またDNPIで誘導体化した後、液体クロマトグラフによって、異性体の純度を測定した結果、2-メチル-4(S)-ヒドロキシペンタンは62.4%、2-メチル-4(R)-ヒドロキシペンタンは37.6%含まれており、4(S)-ヒドロキシ体が優先的に生成していた。2-メチル-4(S)-ヒドロキシペンタンの収率は27.8%であった。

#### 〔発明の効果〕

本発明方法によれば、副産物が少なく効率よく、光学活性アルコールを製造することができる。

出願人 工業技術院長

1 2

1 3



# Blast 2 Sequences results

PubMed

Entrez

BLAST

OMIM

Taxonomy

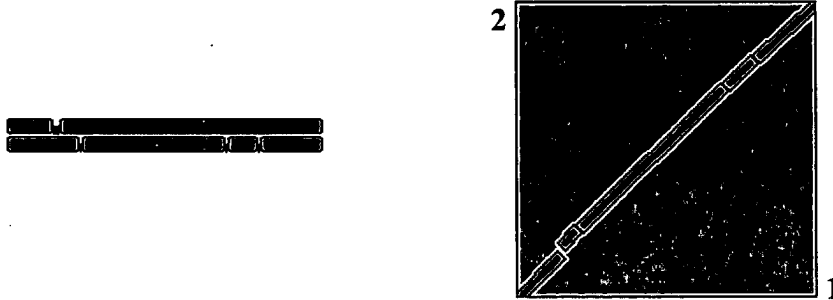
Structure

## BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTP 2.2.10 [Oct-19-2004]

Matrix: **BLOSUM62** ☒ gap open: **11** gap extension: **1**  
x\_dropoff: **50** expect: **10.000** wordsize: **3** Filter ☐ **Align**

Sequence 1 lc|US 03/0054520, SEQ ID NO:2 Length 252 (1 .. 252)

Sequence 2 lc|US 6,706,507, SEQ ID NO:2 Length 254 (1 .. 254)



NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

Score = 173 bits (439), Expect = 6e-42  
Identities = 101/258 (39%), Positives = 145/258 (56%), Gaps = 10/258 (3%)

```
Query: 1  MSNRLDGKVAIITGGTLGIGLAIATKFVEEGAKVMITD-----RHSDVGEKAAKSVGTP 54
          MS      KVA++TG  GIGL++A KF++ GAKV I+D      H V    A+++ T
Sbjct: 1  MSYNFHNKVAVVTGALSGIGLSVAKKFLQLGAKVTISDVSGEKKYHETVVALKAQNLNT- 59

Query: 55  DQIQFFQHDSSDEDGWTKLFDATEKAFGPVSTLVNNAAGI AVNKSVEETTTAEWRKLLAVN 114
          D + + Q DSS E+  KL  T  FG + + NAGI      ET    W+K++AVN
Sbjct: 60  DNLHYVQADSSKEEDNKKLISETLATFGGLDIVCANAGIGKFAPTHETPFDVWKKVIAVN 119

Query: 115  LDGVFFGTRLGIQRMKNKGLGASIINMSSIEGFVGDPSLGAYNASKGAVRIMSKSAALDC 174
          L+GVF  +L I    K    I+NM S+  FV  P L  Y A+KG V+++++ AL+
Sbjct: 120  LNGVFLLDKLAINYWLEKSKPGVIVNMGSVHSFVAAPGLAHYGAAKGGVKLLTQTLALEY 179

Query: 175  ALKDYDVRVNTVHPGYIKTPLVDDLPGAEEAMSQRTKTPMGHIGEPNDIAYICVYLASNE 234
          A  + +RVN+V+PGYI TPL+D++P E    +  P+G +G P ++A    +L S E
Sbjct: 180  A--SHGIRVNSVNPGYISTPLIDEVP-KERLDKLVSLHPIGRLGRPEEVADAVAFLCSQE 236

Query: 235  SKFATGSEFVVDGGYTAQ 252
          + F G    VDGGYTAQ
Sbjct: 237  ATFINGVSLPVDGGYTAQ 254
```

CPU time: 0.02 user secs. 0.00 sys. secs 0.02 total secs.

Lambda K H  
0.315 0.133 0.379

Gapped  
Lambda K H  
0.267 0.0410 0.140

Matrix: BLOSUM62

Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1

Number of Sequences: 1

Number of Hits to DB: 506

Number of extensions: 317

Number of successful extensions: 4

Number of sequences better than 10.0: 1

Number of HSP's better than 10.0 without gapping: 1

Number of HSP's gapped: 1

Number of HSP's successfully gapped: 1

Number of extra gapped extensions for HSPs above 10.0: 0

Length of query: 252

Length of database: 933,971,823

Length adjustment: 128

Effective length of query: 124

Effective length of database: 933,971,695

Effective search space: 115812490180

Effective search space used: 115812490180

Neighboring words threshold: 9

Window for multiple hits: 0

X1: 16 ( 7.3 bits)

X2: 129 (49.7 bits)

X3: 129 (49.7 bits)

S1: 42 (22.0 bits)

S2: 75 (33.5 bits)